

F. V. SELECKÝ, A. BABULOVA, L. BURAN, K. PÁVEK

ANALIZA FARMAKOLOGICZNA NOWEGO GLIKOZYDU NASERCOWEGO

Z Oddziału Farmakologii związków organicznych Zakładu Chemii Słowackiej
Akademii Nauk, Bratysława
Kierownik: dr F. V. Selecký

Celem analizy farmakologicznej i chemicznej zarówno nowego jak i nieznanego preparatu jest uzyskanie możliwie najdokładniejszego obrazu jego działania terapeutycznego. Analityczne metody fizykochemiczne, oprócz identyfikacji służą również do ilościowego oznaczania glikozydów nasercowych, nie wystarczają one jednak do określenia ich właściwości farmakologicznych. Dlatego też do oznaczania działania glikozydów nasercowych wciąż jeszcze musimy stosować metodykę mianowania biologicznego. Mianowanie to informuje nas o działaniu (kardiotoksycznym) badanego preparatu (pod warunkiem, że zatrzymanie czynności serca uwarunkowane jest działaniem glikozydu nasercowego), nie mówi jednak nic o innym jego działaniu na serce. Dlatego w celu zbadania nowego glikozydu nasercowego należy określić jego działanie kardiotoksyczne, a także jego wpływ na kurczliwość mięśnia sercowego, układ przewodzący serca, pracę serca, ekg itp.

W niniejszym doniesieniu chcemy przedstawić nasze doświadczenia z zakresu metodologii analizy farmakologicznej glikozydów nasercowych.

Mianowanie biologiczne

Poszczególne metodyki mianowania biologicznego różnią się między sobą głównie tym, że do badań używa się różnych gatunków zwierząt. Dlatego też przy wyborze najwłaściwszej metodyki rozstrzygające jest dobranie odpowiedniego gatunku zwierząt. Jest rzeczą znaną, że wiele reakcji fizjologicznych i psychicznych zarówno u ludzi jak i u zwierząt pozostaje w zależności od pory roku. Zachodzi więc pytanie, czy wrażliwość zwierząt laboratoryjnych na glikozydy nasercowe jest stale jednakowa,

czy też zależy ona od pory roku. Wrażliwość żab i kotów na g-strofantynę badali Rothlin [1], Chen i wsp. [2], drażliwość zaś gołębi Gawęcka i Wójcik [3]. Myśmy badali drażliwość świnek morskich na g-strofantynę przez okres jednego roku. Jak stwierdzono, istnieje znaczna sezonowa zmienność drażliwości u żab, która w okresie pomiędzy czerwcem, a wrześniem wynosi 100%. Według Rothlina różnica maksymalna pomiędzy lutym a lipcem wynosi 250%. U świnek morskich najmniejsza drażliwość występuje w okresie letnim, największa w zimie.

Porównując średnie wartości poszczególnych kwartałów stwierdza się, że drażliwość w drugim kwartale roku wyraźnie różni się od drażliwości w pozostałych trzech kwartałach. W trzech ostatnich kwartałach roku drażliwość nie ulega istotnym zmianom. Według danych Gawęckiej i Wójcika drażliwość gołębi na glikozydy nasercowe również ulega sezonowym zmianom. U kotów wyniki są bardziej jednolite, a różnice te są stosunkowo niewielkie, dlatego też można uważać, że drażliwość kota na g-strofantynę nie zależy od wpływów roku. Dlatego też koty możemy uważać za zwierzęta najbardziej odpowiednie do zastosowania metodyki biologicznego miareczkowania glikozydów nasercowych. Ujemną stroną jest jednak to, że koty przedstawiają niejednorodny materiał doświadczalny, gdyż pochodzą z różnych źródeł, hodowla zaś kotów jest uciążliwa, ponieważ nie znoszą one przebywania w klatkach. Dlatego uwzględniając stałość warunków doświadczalnych pierwszeństwo należy dać metodyce miareczkowania na świnkach morskich. Sezonowej drażliwości świnek morskich można nie brać pod uwagę, gdyż nowy albo nieznanый glikozyd sercowy zawsze równocześnie porównujemy z glikozydem znanym. Uzyskane wówczas wyniki na świnkach morskich są miarodajne, o ile doświadczenia przeprowadza się w jednakowych warunkach. Istotnym czynnikiem jest tu odpowiedni wybór zwierząt pochodzących z jednego chowu i tej samej płci (samce). Ponadto dużą rolę odgrywa waga zwierzęcia, szybkość infuzji i dawkowanie glikozydów nasercowych, jak również rodzaj narkozy. Waga zwierząt posiada wpływ na uzyskane wyniki w tym znaczeniu, że *dosis letalis minima* (DLM) spada proporcjonalnie do wzrostu wagi zwierzęcia. Nieodpowiednia szybkość dawkowania zwiększa natomiast niebezpieczeństwo przemiareczkowania względnie eliminacji.

Według doświadczeń Krauppa i wsp. najbardziej stałe wartości DLM uzyskujemy przy szybkości dawkowania wynoszącej 2/100—8/100 średniej DLM na minutę. Odnośnie narkozy nadmienić należy tylko, że narkoza eterowa nie nadaje się do tego rodzaju eksperymentów, gdyż zmniejsza DLM, zwiększając zmienność wyników. Według naszych doświadczeń, jak również według doświadczeń większości autorów, najbardziej odpowiednim środkiem narkotycznym do tego rodzaju badań jest uretan.

Przy mianowaniu ważne jest użycie do doświadczeń odpowiedniej liczby zwierząt. Do jednej serii doświadczeń najlepiej jest użyć 12 zwierząt. Jest to dostateczna liczba zwierząt dla dokonania weryfikacji statystycznej, gdyż umożliwia ona uzyskanie małego średniego odchylenia. W naszym materiale ocenę mianowania przeprowadza się na 200 kochach i 600 świnkach morskich, wówczas średni błąd waha się w granicach od 4—6%. Wyniki ze średnim błędem wynoszącym więcej niż 6% nie są miarodajne. Uwzględniając powyższe kryteria warunków doświadczalnych należy uważać, że uzyskane wyniki są dobrym miernikiem kardiotoksycznego działania glikozydów nasercowych.

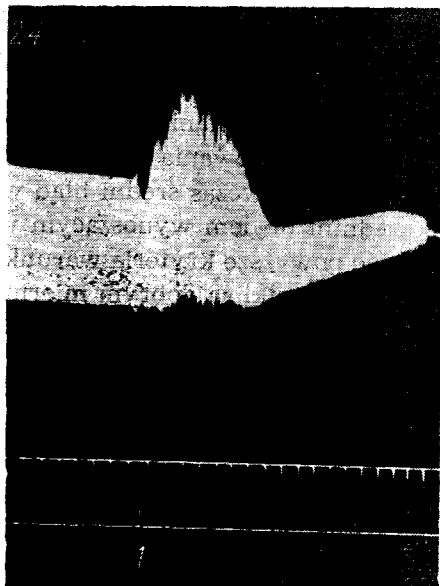
Izolowane serce żaby i ssaka

Przy normalnym zamkniętym krążeniu krwi efekt działania glikozydu na serce może być uwarunkowany wieloma czynnikami krążenia. Aby zbadać działanie glikozydu na serce przeprowadzamy doświadczenia na izolowanym narządzie, głównie na izolowanym sercu żaby lub ssaka. Doświadczenia te informują nas głównie o skurczowej sile mięśnia sercowego, o częstości akcji serca i o szybkości przewodzenia bodźca przez układ przewodzący. Istota działania glikozydów nasercowych polega na przyspieszeniu i zwiększeniu siły skurczów komór (dodatnie działanie inotropowe) jak to widać na ryc. 1.

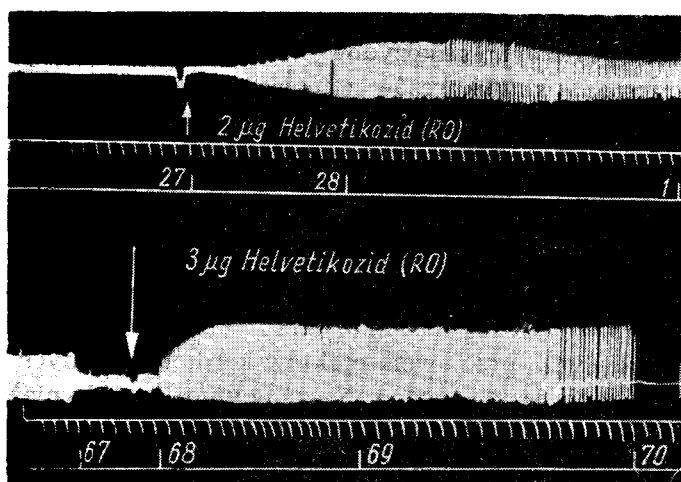
Ryc. 1 przedstawia zapis pochodzący z izolowanego serca żaby po zastosowaniu 2 mikrogramów glikozydu szwajcarskiego. Po zadziałaniu glikozydu zwiększa się siła skurczu serca, zaś po dłuższym stosowaniu glikozydu zmniejsza się rozkurcz serca z czego wynika, że kardi toniczne działanie glikozydów przechodzi w działanie kardiotoksyczne aż do zatrzymania serca. Powyższe działanie glikozydów na normalne serce jest według Geigera i wsp. przejawem efektów kardiotoksycznych.

Metodyka badania izolowanego serca żaby umożliwia również obserwację działania glikozydów na serce niewydolne. Model niewydolnego serca można uzyskać przez osłabienie czynności serca, w wyniku dłuższej pracy, bądź w wyniku działania różnych środków farmakologicznych a mianowicie alkoholu etylowego, chloroformu, acetylocholino, jak też obniżając stężenie wapnia w płynie odżywiającym. Działanie glikozydów na serce uszkodzone jest według Geigera i wsp. czystym działaniem terapeutycznym.

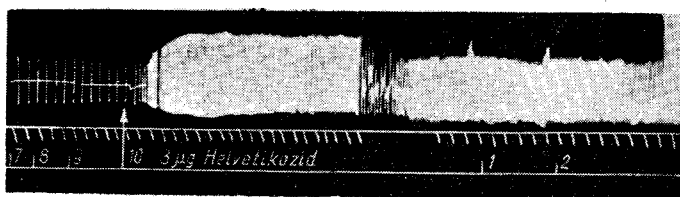
Ryc. 2 przedstawia zapis czynności izolowanego serca żaby. Czynność serca została osłabiona przez obniżenie stężenia jonów Ca w płynie odżywiającym. Liczba 27 oznacza zastosowanie dwóch mikrogramów, liczba zaś 66 trzech mikrogramów glikozydów szwajcarskich.



Ryc. 1.



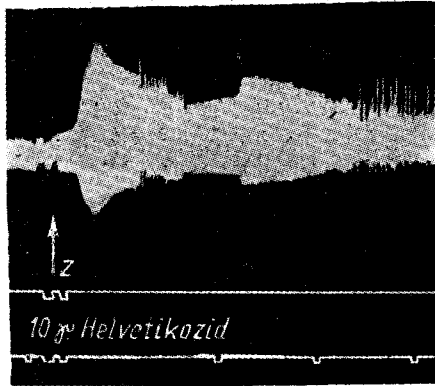
Ryc. 2.



Ryc. 3.

Na ryc. 3 widzimy, że zastosowanie 3 mikrogramów glikozydów szwajcarskich wywiera dodatnie działanie inotropowe z następującą normalizacją częstości skurczów serca.

Dogodność metodyki izolowanego serca polega na szybkości i łatwości jej wykonania oraz niewysokich kosztach. Ujemną stroną tej metodyki jest to, że różnice zachodzące pomiędzy zwierzętami zimnokrwistymi i człowiekiem są zbyt wielkie i dlatego np. preparat, który u żab wywiera silne działanie nasercowe, na serce człowieka może działać bardzo słabo. Inną ujemną cechą tej metodyki jest niejednakowa wrażliwość poszczególnych żab na badany lek. Z wyżej wymienionych powodów tego rodzaju



Ryc. 4.

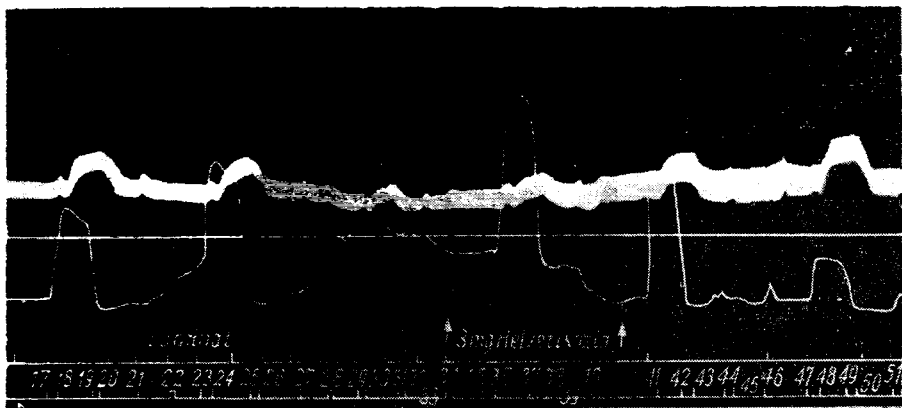
badania poleca się wykonywać na izolowanych sercach ssaków. Przeprowadzanie doświadczeń jest w zasadzie takie samo, jak na izolowanym sercu żaby a uzyskane wyniki są do siebie zbliżone.

Ryc. 4 przedstawia zapis czynności izolowanego serca królika. Po zastosowaniu 10 mikrogramów glikozydów szwajcarskich doszło do zwiększenia siły skurczu serca z następującą arytmia.

Preparat sercowo-płucny

W odróżnieniu od izolowanego serca ssaków, na preparacie sercowo-płucnym możemy oznaczać ilościowe właściwości terapeutyczne badanych glikozydów. Najważniejsze jest oznaczanie działania dodatnio inotropowego i określanie wachlarza terapeutycznego glikozydów. Metodzie tej należy dać pierwszeństwo również i dlatego, że preparat sercowo-płucny może nam służyć jako model serca niewydolnego. Jako zwierzęta doświadczalne służą nam psy lub koty. Model niewydolnego serca można uzyskać przez podanie leków depresyjnych jak barbiturany bądź przez szybkie wyczer-

panie serca pracą, zwiększając opór obwodowy. Po powtórnych podawaniu barbituranów zmniejsza się minutowa i skurczowa objętość serca. Równocześnie dochodzi do spadku ciśnienia tętniczego krwi, natomiast ciśnienie żyłne wzrasta. Gdy podajemy w jednakowych odstępach czasu małe dawki badanego glikozydu, czynność serca szybko poprawia się, minutowa i skurczowa objętość serca osiągają wartości szczytowe, ciśnienie żyłne zaś osiąga swe wartości najmniejsze. Po podaniu dawek następnych w krótkim czasie dochodzi do zaburzeń rytmu, praca serca powoli pogarsza się aż w końcu dochodzi do zatrzymania czynności serca i krążenia krwi.



Ryc. 5.

Przy takiej kolejności postępowania w doświadczeniu możemy obliczyć optymalną terapeutyczną dawkę, dawkę toksyczną wywołującą niemierność oraz dawkę śmiertelną. Stosunek dawki śmiertelnej i optymalnej terapeutycznej określa wachlarz terapeutyczny badanego glikozydu.

Odmienny sposób oceny właściwości dodatnio inotropowych serca przedstawia ryc. 5, na której ukazane zostało działanie szwajcarskiego glikozydu nasercowego na siłę rezerwową mięśnia sercowego.

Ryc. 5 przedstawia wykres czynności preparatu sercowo-płucnego kota. Pierwsza krzywa od góry — zmiany ciśnienia tętniczego krwi, druga — zerowe wartości ciśnienia tętniczego krwi, trzecia — ciśnienie żyłne w prawym przedsionku, czwarta — wykres czasu w odstępach minutowych, ostatnia — okresy podawania leków. Przy czasowym zwiększeniu żylnego zbiornika zwiększaliśmy również podaż krwi do serca. Na podstawie następnego wzrostu ciśnienia w prawym przedsionku można określić wielkość siły zapasowej mięśnia sercowego. Pierwsze powiększenie zbiornika żylnego jest doświadczeniem kontrolnym. Dwa dalsze powiększenia wskazują na zmniejszenie siły zapasowej mięśnia sercowego po zastosowaniu

luminalu, ciśnienie żyłne osiąga wówczas wyższe wartości w porównaniu z pierwszym kontrolnym powiększeniem zbiornika żylnego. Po zastosowaniu glikozydów szwajcarskich wzrasta znacznie siła skurczu mięśnia sercowego, na co wskazują dwa kolejno po sobie następujące zwiększenia przesunięcia krwi żyłnej do serca.

Chociaż uszkodzone serce jest modelem serca niewydolnego i można na nim mierzyć ilościowo terapeutyczne właściwości glikozydów, stanowi ono jednak tylko preparat, w którym pominięto nerwową i humoralną regulację czynności serca. Ten brak staramy się wyrównać w naszej pracowni przez wypracowanie bardziej doskonałych metod doświadczalnych, które nam pozwolą badać wpływ glikozydów na serce i krążenie krwi w całym ustroju zwierzęcia przy zastosowaniu minimum zabiegów chirurgicznych.

Zmiany elektrokardiograficzne po zastosowaniu glikozydów nasercowych

Glikozydy nasercowe wywołują charakterystyczne zmiany w częstotliwości powstawania impulsów sercowych, w miejscu ich powstawania oraz w ich przewodzeniu przez układ bodźczo-przewodzący, oprócz innych zmian w przebiegu repolaryzacji. Zmiany powyższe są charakterystyczne dla wszystkich glikozydów i w ich powstawaniu można odróżnić trzy fazy [6]:

1. Faza początkowa, charakteryzująca się rytmem zatokowym, który początkowo jest prawidłowy lecz stopniowo ulega zwolnieniu. Przy końcu fazy początkowej powstaje niemiarowość zatokowa z prawidłowym przewodnictwem do komór lub może powstać rozkojarzenie przedsionkowo-komorowe tzw. blok sercowy przedsionko-komorowy pierwszego stopnia.

2. Faza toksyczna, która jest zwykle zapoczątkowana przedwczesnym skurczem komór. Jej przebieg charakteryzuje się nieprawidłowym rytmem pochodzącym z różnych ośrodków komorowych z postępującym przyspieszeniem czynności serca oraz z powstawaniem zniekształconych krzywych zespołów komorowych.

3. Faza śmiertelna, która charakteryzuje się występowaniem naprzemian migotania komór z nieprawidłowym rytmem ektopicznym.

Obraz krzywej elektrokardiograficznej kończy się bezładną pracą komór z występowaniem małych, spłaszczonych fal, które są końcową oznaką czynności elektrycznej zamierającego serca.

Powszechnie uważa się, że przy trwałej infuzji glikozydów dochodzi do stałego przechodzenia glikozydów do serca, czyli do powolnego postępującego zatrucia serca. Gdy wykonywaliśmy perfuzję glikozydów świnkom

morskim, mierzyliśmy równocześnie ciśnienie krwi w tętnicy szyjnej i okazało się wtedy, że w fazie śmiertelnej przy migotaniu komór następuje spadek ciśnienia krwi do wartości prawie zerowych, dochodzi więc do zatrzymania krążenia. To zatrzymanie krążenia jest odwracalne i przy przejściu migotania w anarchię komorową powstaje natychmiast efekt presyjny i następuje wzmożenie krążenia. Ten cykl w fazie śmiertelnej powtarza się kilkakrotnie. Możemy z tego wnioskować, że działanie glikozydu nie trwa stale i że po pierwszym migotaniu, glikozyd przenika do układu żylnego, w którym gromadzi się do momentu krótkotrwałego wznowienia krążenia krwi. Z fizjologicznego punktu widzenia należy uważać, że zakończenie miareczkowania występuje z chwilą powstania pierwszego migotania serca.

Na podstawie naszych danych doświadczalnych możemy stwierdzić, że zmiany elektrokardiograficzne powstałe w wyniku działania na serce glikozydu, są dostatecznym dowodem jego działania kardiotoksycznego.

W dalszych badaniach należy kłaść nacisk na rozwój innych metod doświadczalnych aby uzyskane wartości względne chociaż trochę przybliżyć do wartości absolutnych w zakresie zmian hemodynamicznych. Niemniejszą uwagę należy poświęcić badaniom zmian biochemicznych, które warunkują działanie dynamiczne leków nasercowych. Zdajemy sobie sprawę z trudności wykonywania tych badań, które jednak są konieczne aby poznać nowe ciała farmakologiczne swoicie działające na układ sercowo-naczyniowy.

PISMIENNICTWO

1. Rothlin E.: Pharm. Acta Helv. 1947, 22, 418.
2. Chen K. K., Henderson F. G., Robbins E. B.: Y. Pharm. exper. Therap. 1953, 107, 131.
3. Gawecka I., Wójcik R.: Acta Physiol. Pol. 1959, 10, 423.
4. Kraupp O., Obenaus H., Pillat B., Stumpf Ch.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 1959, 237, 388.
5. Geiger E., Yarisch A.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 1922, 94, 52.
6. Bauer H., Reindell H.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 1938, 190, 461.